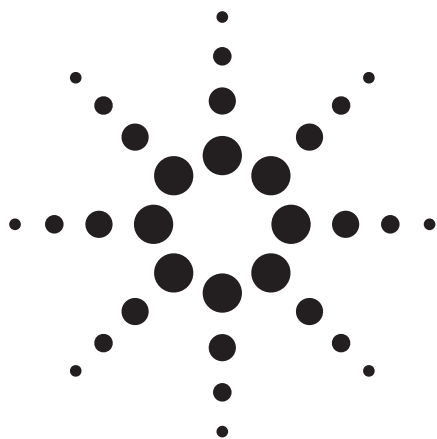




2004 年アテネオリンピック期間中の アテネドーピングコントロールラボにおける、 Agilent 1100 LC/MSD Trap 質量分析計を 用いた 23 種類のコルチコステロイド、 蛋白同化剤、 $\beta 2$ 作用剤の検出 アプリケーション

法科学

著者

Costas Georgakopoulos
Doping Control Lab of Athens
37 Kifissias Ave.
GR-151-23 Maroussi/Athens
Greece

Efstathios Sianos
HELLAMCO
7 Marathon St.
GR-152-33 Chalandri/Athens
Greece

Georges Tsoupras
Agilent Technologies Europe B.V. Meyrin Branch
39, Rue de Veyrot
Meyrin 1 (Geneva)
CH 1217
Switzerland

要旨

蛋白同化剤、コルチコステロイド、 $\beta 2$ 作用剤は、いずれも競技能力を高める薬剤とみなされており、競技の公正を維持するために、ほとんどの国際的なスポーツ機関が使用を規制しています。競技者によるそうした薬剤の使用を監視することは、競技者の健康にとってもプラスになるとされています。2 週間にわたる 2004 年アテネ夏季五輪の開催期間中には、複数のイオントラップ分析機器が 24 時間フル稼働し、抽出尿サンプルが世界アンチドーピング機構

(WADA) の定める最小要求性能限界 (MRPL) を満たす条件で分析されていました。本レポートでは、Agilent 1100 シリーズ HPLC を LC/MSD Trap SL と組み合わせ、規制物質の分析を行なっています。それぞれの機器では、エレクトロスプレーイオン化源 (SI) が使用されています。各物質の MRPL は、蛋白同化剤で尿 1 mL 中 30 ng、コルチコステロイドおよび $\beta 2$ 作用剤で尿 1 mL 中 10 ng ですが、本手法ではこの基準が容易に満たされています。例えばトリウムシノロンアセトニドでは尿 1 mL 中 1 ng、合成麻薬のテトラヒドロゲストリノンでは尿 1 mL 中 0.5 ng 未満の検出が可能です。また、膨大なサンプルロード数にもかかわらず、機器感度は 2 週間を通じて維持されました。

はじめに

国際的なスポーツ機関のほとんどは、1970 年代までに薬物検査を導入しています。当時、筋力を要求される競技を中心に、蛋白同化剤の使用が広まっていましたが、有効な検出手法は存在しませんでした。信頼できる検査手法が導入されたのは 1974 年になってからで、1976 年には国際オリンピック委員会 (IOC) が蛋白同化剤を禁止薬物リストに追加しました。これにより、1970 年代後半には、投てきや重量挙げなどの筋力を要する競技を中心に、薬物の不正使用による失格件数が増加しました。

その後、競技能力を強化する禁止物質のリストは拡大され、現在では蛋白同化剤のほか、コルチコステロイドと $\beta 2$ 作用剤もそのなかに含まれています。蛋白同化男性化ステロイド剤は、天然物質としても合成物質としても存在し、テストステロンと同様の働きをします。すなわち、性徴 (男性ホルモン作用) や筋肉組織の緩やかな成長 (蛋白同化作用)



Agilent Technologies

を促します。コルチコステロイドは、近代医薬のなかでも、もっとも強力な抗炎症薬です。コルチコステロイドを大量に摂取すれば、傷ついた筋肉や炎症を起こした関節の治癒を促進し、競技能力を高めることが可能です。β2 作用剤は喘息の治療薬で、他に治療法のない喘息患者でのみ、吸引投与が認められています。

本レポートで分析する化合物のほとんどは、極性があり、熱に不安定な物質です。そのため、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 手法に適しているだけでなく、尿中の薬物検査ではより伝統的な手法であるガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) よりも勝れています。さらに、MS/MS (MS²) により生成される各化合物固有の生成イオンのイオン比測定に必要な感度では、イオントラップ質量分析に並ぶものはありません。複数段の MS ステージで分析すれば、共溶出する化合物を識別できるので、紫外吸収 (UV) 定量に求められるような高いクロマトグラフィー分離能も必要なくなります。また、MS/MS/MS (MS³) の優れた化合物特異性により、同一の前駆イオン質量や類似の生成イオン構成を持つ化合物を識別することができます。イオントラップによる分析手法は、生成イオンに対する感度という点でトリプル四重極装置よりも優れていますが、それに加えて、一般的に低価格であるという点も、重要な考慮事項です。

本研究では、MS² および MS³ の両ステージにおいて、特許技術である LC/MSD Trap の SmartFrag 機能を用いて、再現可能なフラグメントイオンスペクトルを生成しました。このテクニックを使用すれば、構造決定に使用される、感度の高い多様な生成イオンを生成するのに必要なエネルギーを前駆イオンに与えることが可能になります。定量にあたっては、各化合物の生成イオンの生成を最適化し、マルチブルリアクションモニタリング (MRM) 手法を使用しました。注目すべきは、オリンピックの開催期間中、4000 を超えるサンプルを分析しながら、少なくとも 20 日間にわたって WADA の指針に基づく厳しい要件を満たし続けなければならなかったという点です。そのため、直線性と室内再現精度が、競技の公正を確保するためだけでなく、アテネのドーピングコントロールラボの評判を守るためにも重要な要素となりました。分析した化合物を以下に示します。

コルチコステロイド

トリアムシノロン、16α-ヒドロキシプレドニゾン (ブデソニド代謝産物)、コルチゾール、プレドニゾン、フルドロコルチゾン、プレドニゾン、コルチゾン、メチルプレドニゾン、ベタメタゾン、デキサメタゾン、フルメタゾン、ベクロメタゾン、フルニソリド、フルオコルトロン、トリアムシロノンアセトニド、デソニド、ブデソニド

β2 作用剤

フォルモテロール

蛋白同化剤

トレンボロン、エピトレンボロン (トレンボロン代謝産物)、ゲストリノン、THG、ヒドロキシメチルフォルメボロン (フォルメボロン代謝産物)

内部標準 (ISTD)

メチルテストステロン

注：THG (テトラヒドロゲストリノン) は、同じく禁止ステロイドであるゲストリノンを化学修飾した合成デザインステロイドです。図 1 参照。

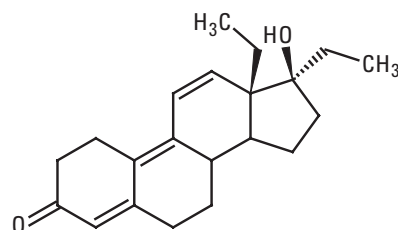


図 1. 合成デザインステロイド THG

実験手法

サンプルの前処理

GC/MS 分析における標準的な抽出手順を使用しました。ただし、最終手順の化合物誘導体化の代わりに、サンプルを LC 移動相で最溶解しました。

2.5-mL の尿サンプルに内部標準 (メチルテストステロン) を添加します。その後、β-グルクロニダーゼ (Helix Pomatia 由来) を用いて、pH7、50 °C で 1.5 時間、酵素加水分解を行ないます。また、5.0 mL ジエチルエーテルにより、pH 10 でアルカリ抽出を行ないます。脱塩剤には硫酸ナトリウム 1 g を使用します。20 分間攪拌した後、遠心分離にかけます。エーテル相を円錐チューブに移し、窒素気流下で蒸発させ、乾燥させます。最後に、尿抽出液を移動相 100 μL で最溶解しました。

LC/MS/MS 手法の詳細(例)

LC 条件

装置：	Agilent 1100 HPLC
カラム：	ZORBAX RX-C8、2.1 mm x 150 mm、 粒子サイズ 5 µm
移動相：	A = 0.1%酢酸水 B = アセトニトリル
グラジエント：	1 分で 15% B 8 分で 40% B 12 分で 40% B 15 分で 90% B 17 分で 100% B ポストラン：4分
流量：	0.4 mL/min
注入量：	10 µL

MS 条件

装置：	Agilent LC/MSD Trap SL
イオン化モード：	ポジティブESI
乾燥ガス流量：	10 L/min
ネブライザ：	50 psig
乾燥ガス温度：	325 °C
V _{cap} ：	3500 V
スキマー 1：	15.0 V
キャピラリ出口電圧：	50.0 V
スキャン：	m/z 100–400 amu.
通常分解能：	13,000 amu/s
平均：	2
ICC：	オン 最大積算時間：20 ms ターゲット：30000 MRMモード：10セグメント
定性：	
フラグメント振幅：	1.0 V
SmartFrag：	オン、30% - 200%
定量：	
フラグメント振幅：	各化合物に最適化

結果と考察

多くのイオントラップ MS システムに見られる欠点のひとつに、生成イオンの少なさがあります。これは、前駆イオンがイオントラップにとどまる時間が比較的短いことが原因です。ギリシャのアテネで開催された 2004 年夏季五輪で、分析対象となる化合物の同定に成功した大きな要因は、特許技術である Agilent LC/MSD Trap の SmartFrag 機能でした。図 2 には、SmartFrag のランプ衝突誘起乖離 (CID) テクニックにより生成された各種の生成イオン例を示しています。このテクニックでは、フラグメントエネルギーをユーザーの定義したフラグメント電圧 (本研究では 1 ボルト) の 30 % から 200 % まで (ユーザーによる調節可能) の範囲でランプすることができます。この例では、プレドニゾンについて、LS/MSD Trap の SmartFrag 機能を用いて最適なフラグメントを多く含んだ一連の MS/MS スペクトルを生成しました (図 2C 参照)。

従来のイオントラップとは異なり、Agilent LC/MSD Trap では、CID 電圧エネルギーを所定のエネルギー範囲で速やかにランプできるので、各分析化合物にもっとも適したエネルギーを利用することができます。Agilent LC/MSD Trap の SmartFrag 機能により、時間のかかる衝突電圧の最適化手順を省くことができます。そのため、フラグメントが豊富なフルスキャンの生成イオンスペクトルを効率良く導き出し、定性や構造決定を行なうことができます。

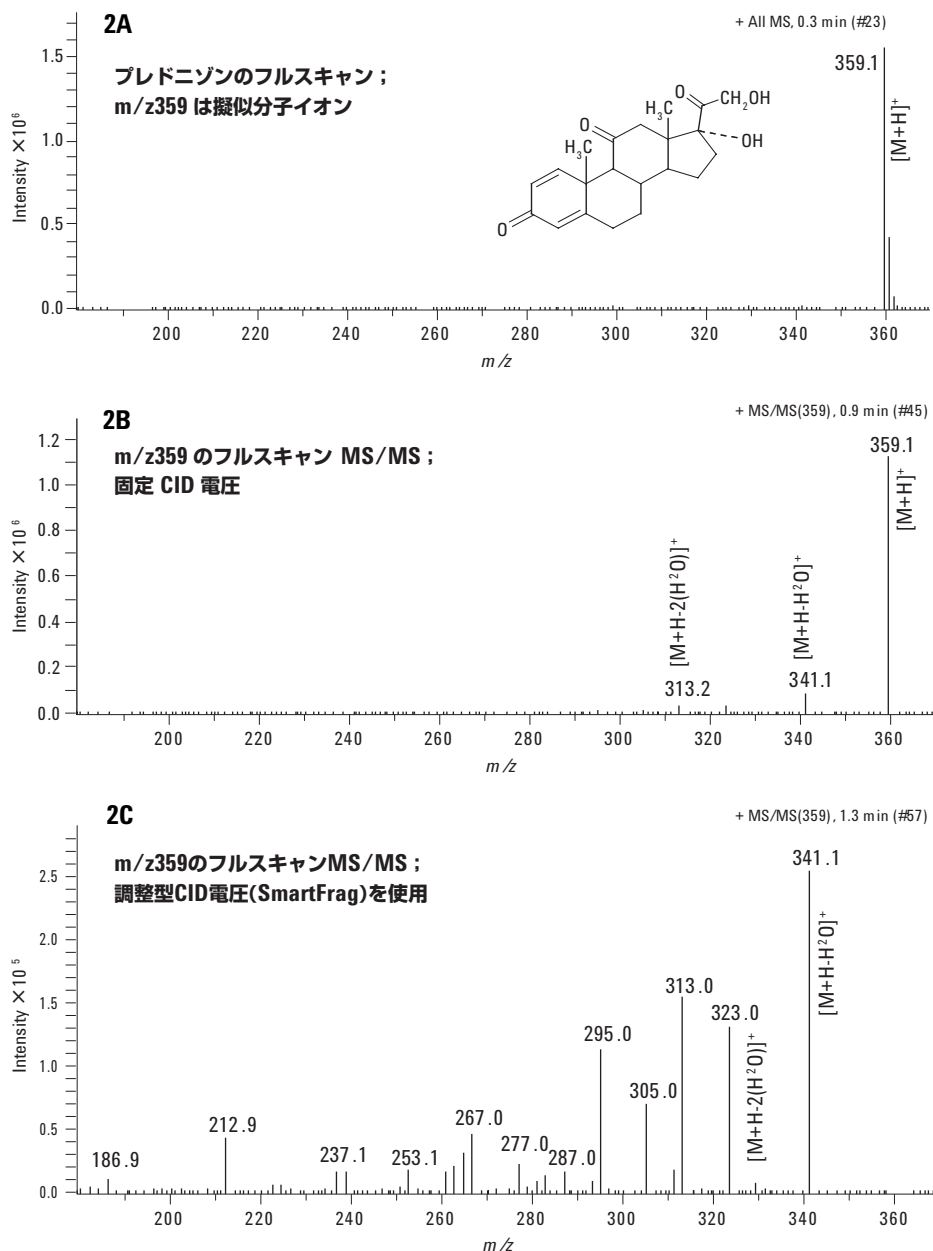


図 2. プレドニゾン分析での SmartFrag の有効性

生成した質量スペクトルは、その化合物の構造に固有のイオンを示していると考えられます。WADA の要件で定められた、相対アバンダンスで 5 %を超える生成イオンのアバンダンスは、禁止物質の存在を素早く確認するためのツールとして利用され、シーケンス毎に併せて分析される標準品質管理 (QC) サンプル (MRPL 濃度の禁止物質を添加したブランク尿サンプル) と競技者のサンプルが比較されます。

同定による検出の例として、競技者が治療目的でトリアムシノロンアセトニドを投与されていて陽性判定となったケースを紹介します。図 3 には、バックグラウンド除去後のサンプル化合物の質量スペクトルがライブラリと一致した結果を示しています。Fit、reverse Fit (RFit)、Purity (NIST アルゴリズム) の値は、いずれも 950 (完全一致を 1000 として) を上回りました。

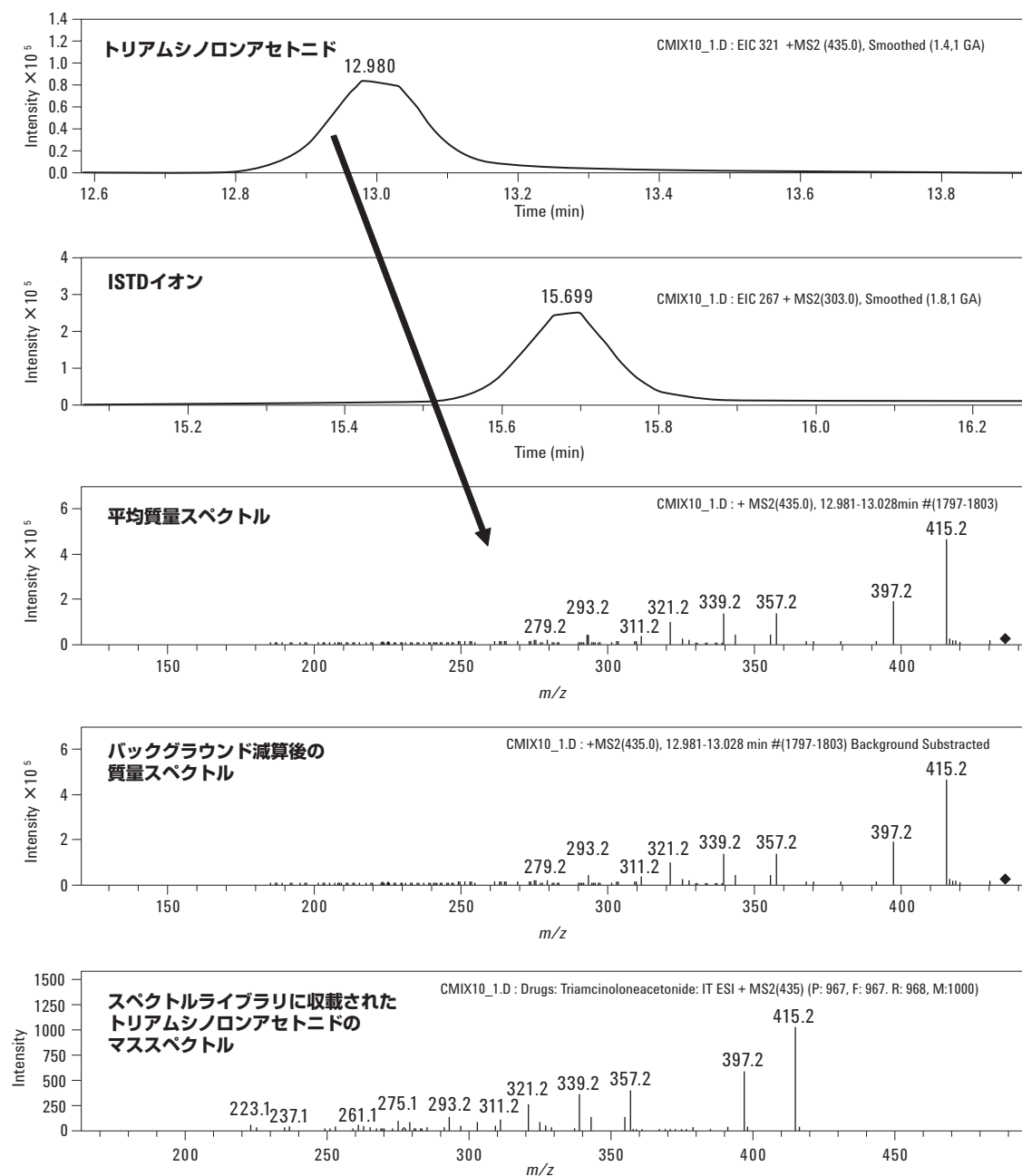


図 3. 陽性判定の検出手順—競技者サンプル。ライブラリー致：Purity (P) = 967 ; Fit (F) = 967 ; reverse Fit (R) = 968

シーケンス毎に分析される QC サンプルは、確認目的のほか、オリンピックの検査期間中におけるシステムの安定性をモニターする目的でも使用しました。図 4 は、20 日の期間中における LC/MSD Trap SL を用いた定量の室内再現精度を示しています。各分析機器では 1100 点を超えるサンプルを分析しましたが、その間、簡単に手入れのできるソースチャンバー部以外は日常的なメンテナンスを一切行なっていません。

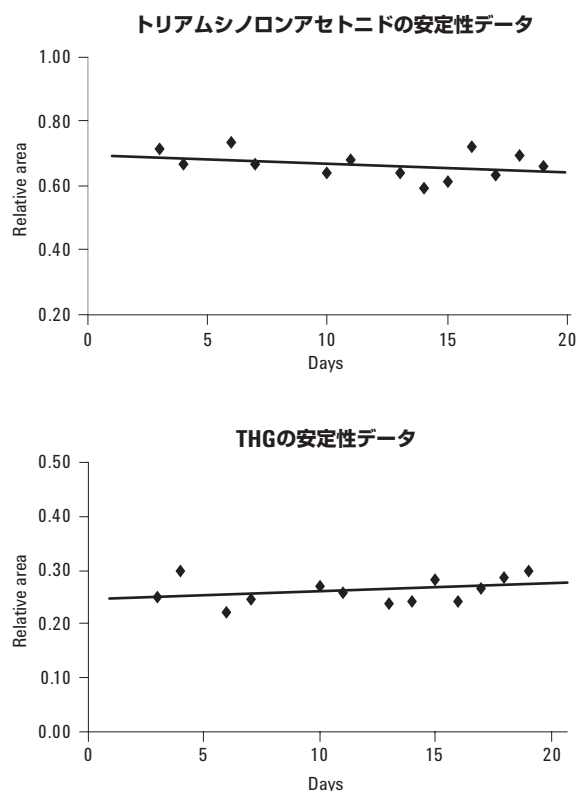


図 4. システムの安定性。化合物面積（トリアムシノロンアセトニドおよびTHG）をISTD面積（メチルテストステロン）で割って算出。

直線性を検証するため、オリンピック開始前に 3 種類の化合物を分析した結果を図 5 に示します。各検量線の各濃度レベルは、2 つの同一サンプルを各 2 回（全 4 回）分析した平均から算出しました。相対レスポンスは、化合物の面積を ISDT の面積で割って算出しました。すべての検量線が、0.99 以上の直線性係数 (r^2) を示し、切片はほぼ 0 でした。また、各プロットの最も高いキャリブレーション濃度は WADA の MRPL 限界に対応しています。このことから、システム感度が WADA の MRPL 限界を遥かに下回っていることがわかります。

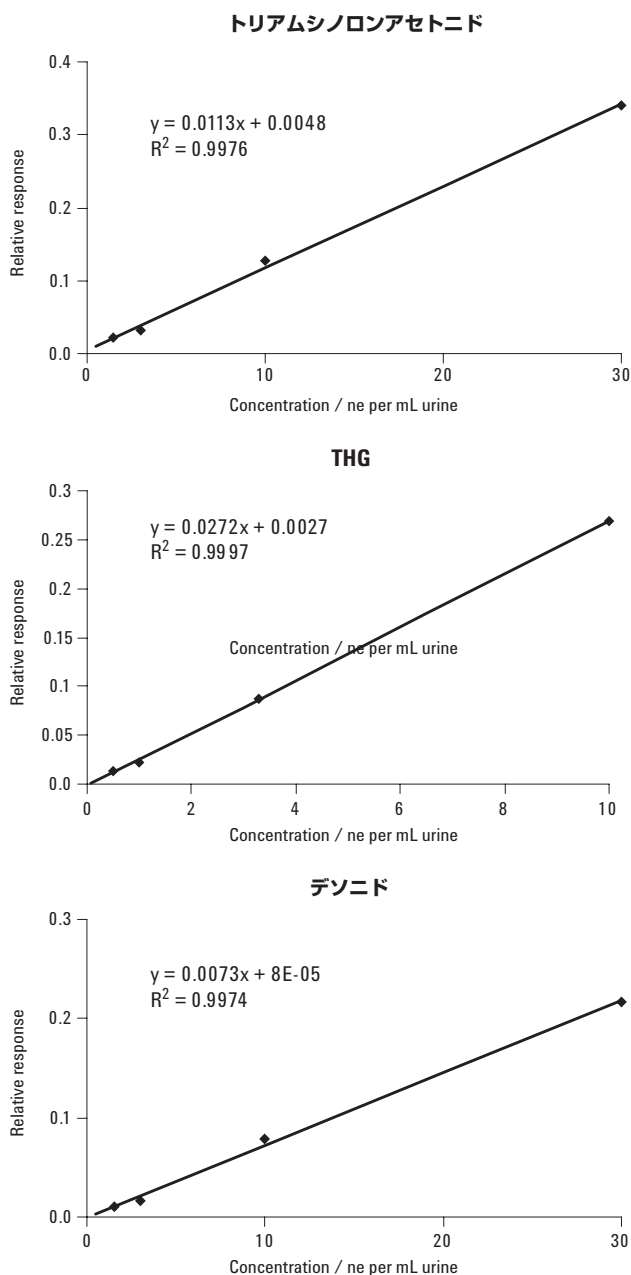


図 5. トリアムシノロン、THG、デソニドを用いた直線性の検証

図 6 に、QC サンプル結果の出力例を示します。この図は ISTD を含む 6 つの化合物の結果から構成されています。各化合物は 3 種類の確認イオンを用いて分析され、3 つの図は上から強度の低い順に並んでいます。図で比較することにより、薬物検査ミスを視覚的に簡単に確認できます。

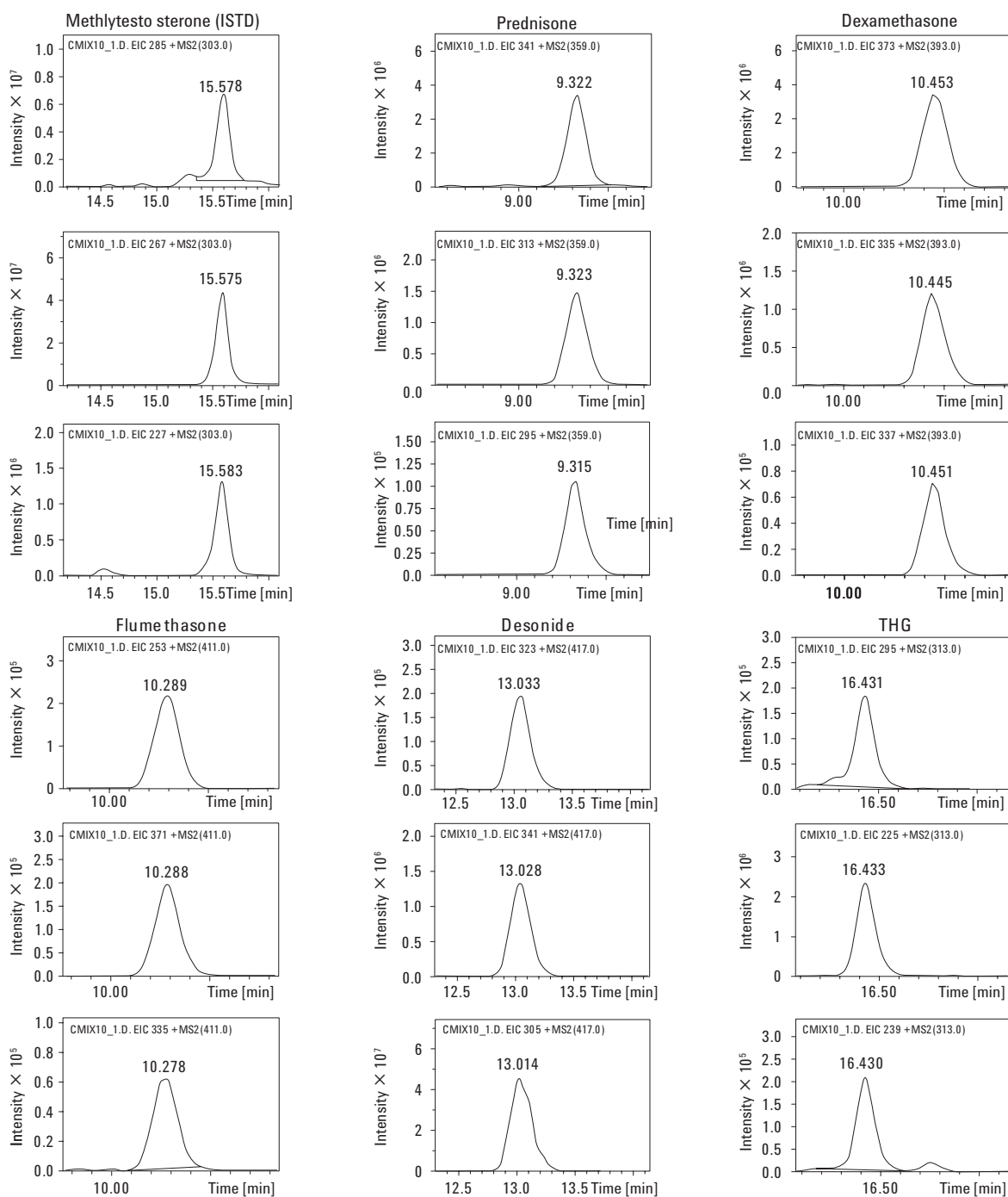


図 6. スクリーニング QC サンプルの出力例

陽性となった競技者サンプルの検査結果(ライブラリとの一致は図 3 を参照)に話を戻します。この例では、トリアムシノロンアセトニドの濃度は、尿 1 mL 中 15 ng 以下と確認されていますが、プライバシー保護のため、これ以上の詳細は公開できません。図 7 参照。

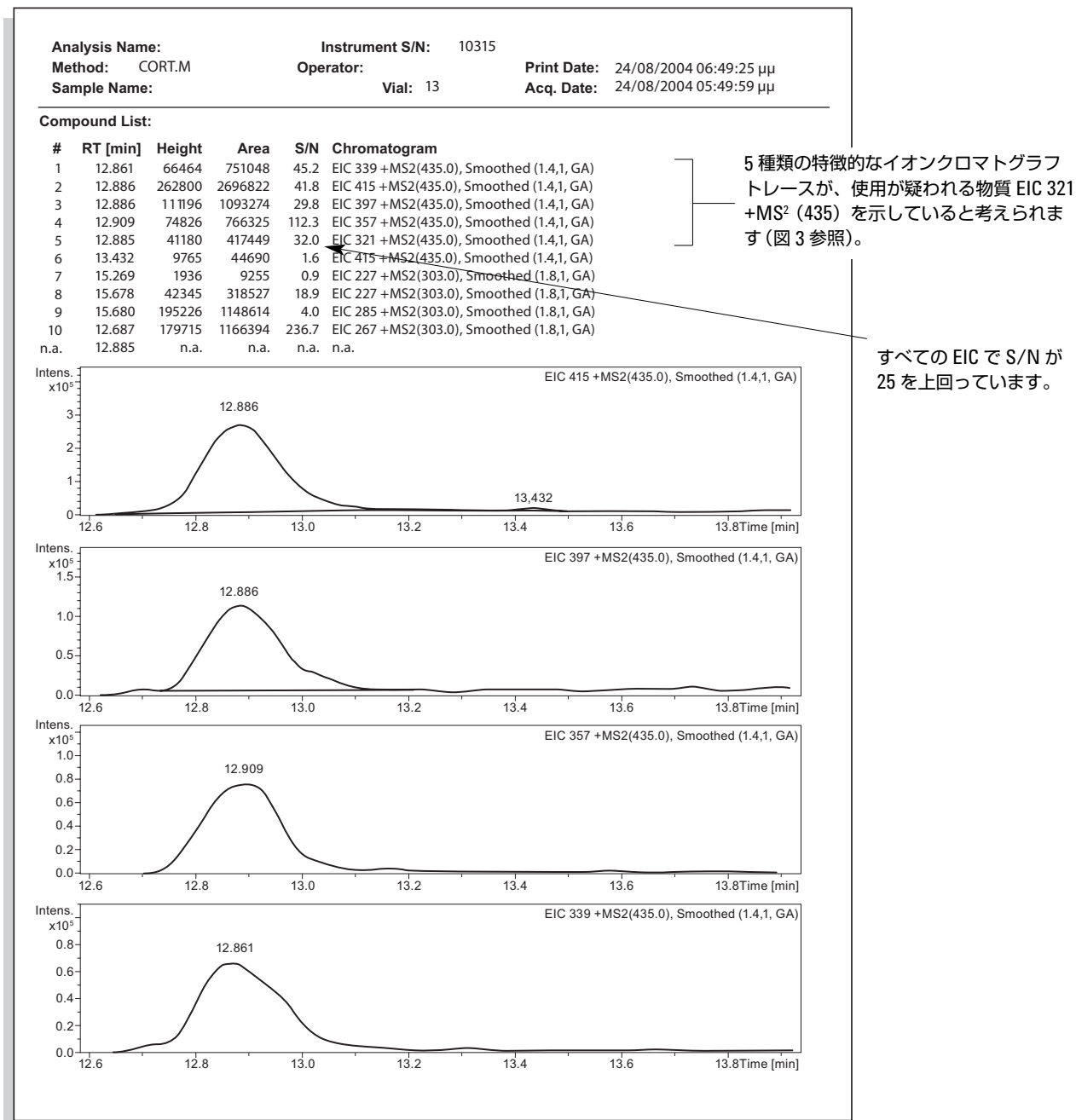


図 7. 陽性判定の検査結果—競技者サンプル、定量

結論

本研究では、ギリシャのアテネで開催された 2004 年夏季五輪の期間中、出場選手の尿サンプルから競技能力を高める薬剤を検出するにあたって、Agilent LC/MSD Trap SL が優れた性能を発揮したことが示されています。LC/MSD のフルスキャン MS/MS 機能を使用することで、WADA の感度基準を容易にクリアしています。さらに、特許の Smart-Frag 技法を用いて、前駆イオンに適用するフラグメント電圧をランブすることにより、 MS^2 と MS^3 の両レベルで感度の高い特異的な生成イオンを生成できます。これにより、尿に含まれる 23 種類もの規制化合物を同定および確認することが可能です。

本アプリケーションノートに関する詳細をお知りになりたい方は、Georges_Tsoupras@Agilent.com までご連絡ください。

さらに詳しくは...

弊社製品とサービスについてさらに詳しい情報をご希望のお客様は、弊社ウェブサイト(www.agilent.com/chem/jp)をぜひご覧ください。

お問い合わせは： 0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町 9-1

Agilentは本文書に含まれる誤り、および本文書の内容または使用に関連して、付随的または間接的に引き起こされる損害について、一切の責任を負いません。

本文書に記載の情報、説明、および仕様は、予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in the USA
July 11, 2005
5989-3395JAJP



Agilent Technologies